Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Vol. 15, No. 5, Dec- Jan 202, p. 529-542

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 5، آذر- دی 1398، ص. 542-529

استخراج ترکیبات فنولی میوه عناب با سیال فوق بحرانی کربن دی‌اکسید و بهینه‌سازی و اندازه گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی آن

فاطمه فرزانه مقدم[1]- جواد سرگلزایی*[2]- شادی بلوریان[3]

تاریخ دریافت: 1397/05/15
تاریخ پذیرش: 1398/02/15

چکیده

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اصولاً ترکیبات فنولی، پلی‌فنولی و کاروتنوئیدی هستند که در میوه درخت عناب یافت می‌شود. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی شرایط استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب به دو روش حلالی و روش سیال فوق بحرانی کربن دی‌اکسید جهت یافتن نقاط بهینه استخراج و کاهش میزان حلال مصرفی و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی می باشد. در روش استخراج با حلال از طرح باکس بنکن با سه متغیر دما، زمان و نسبت حلال و در روش فوق بحرانی از طرح مرکب مرکزی با دو متغیر دما و فشار جهت بهینه‌سازی استفاده شده است. دما، زمان و نسبت حلال‌ها در روش استخراج با حلال برای رسیدن به حداکثر میزان فنول کل به‌ترتیب برابر 43/54oC، 3/46 hr و 44/92 درصد به‌دست آمد و نسبت حلال و دما بیشترین تاثیر را بر میزان فنول کل دارا بودند. همچنین دما و فشار در روش فوق بحرانی برای رسیدن به حداکثر میزان فنول کل برابر 34/19oC و 323 bar حاصل شد. میزان فنول کل استخراجی در نقطه بهینه در روش استخراج با حلال برابر 26/21 و در روش فوق بحرانی برابر 22/74 میلی‌گرم گالیک اسید به گرم عصاره خشک بود. در خصوص خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز IC50 در نقطه بهینه در روش استخراج با حلال برابر 581/6 و در روش فوق بحرانی برابر 532/8 بود. در هر دو روش میزان فنول کل رابطه مستقیم با فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت و روش فوق بحرانی با وجود برخورداری از میزان فنول کمتر دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود.

واژه‌های کلیدی: میوه عناب، بهینه‌سازی، ترکیبات فنولی، روش فوق بحرانی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

اصطلاح آنتی‌اکسیدان به ترکیباتی گفته می‌شود که در حضور آن‌ها اکسید شدن یک ماده به تأخیر می‌افتد و یا از آن جلوگیری می‌شود که این امر باعث تثبیت کیفیت غذا می‌شود (Collins, 2005). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اغلب ترکیبات فنولی هستند که در همه بخش‌های یک گیاه وجود دارند. این ترکیبات متابولیت‌های ثانویه هستند که به دلیل دارا بودن خصوصیات اکسایش و کاهشی می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن را با دادن اتم هیدروژن و تبدیل آن‌ها به ترکیبات غیررادیکالی پایدارتر مهار کنند. همچنین توانایی شلاته کردن فلزات را نیز دارند (Wijngaard *et. al.*, 2009 و Erasto *et al.*, 2007). با توجه به اثرات مثبت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی تحقیقات بسیاری در جهت استخراج، شناسایی و کاربرد آن‌ها از منابع گیاهی مختلف صورت گرفته است. میوه خوراکی *عناب*4 یک عضو از خانواده *رامناسه‌آ*5 می‌باشد که در ایران با نام *عناب* شناخته می‌شود. گیاهان خانواده *عناب* از گل‌سرخ‌سانان می‌باشند که همگی دیپلوئید بوده و دارای 24 کروموزوم هستند. درخت عناب از هزاران سال پیش در چین کشت می‌شده و به‌عنوان دارو، غذا و طعم‌دهنده غذایی استفاده می‌شود، این درخت همچنین در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری اروپا، استرالیا و آسیای جنوبی نیز توزیع‌شده است (Su *et al.*, 2005 و Yan *et al.*, 2002و Preeti *et al.*, 2014).

ترکیبات فنولی به‌طور عمده دارای پتانسیل بالای آنتی‌اکسیدانی هستند و یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان به‌حساب می‌آیند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عناب ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در آن نظیر فلاونوئیدهای، فنولیک‌های کل، آنتوسیانین و آسکوربیک اسید می‌باشد (Zhao *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2010). پوسته، پالپ و دانه میوه *عناب* دارای گستره وسیعی از ترکیبات فنولیک می‌باشند و از گذشته‌های دور به‌عنوان دارو و عامل طعم‌دهنده استفاده می‌شود (Mahajan *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010). مطالعات بسیاری اثرات درمانی

1و 2- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد.
3- استادیار گروه پژوهشی افزودنی های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی.
(*- نویسنده مسئول: Email: sargolzaei@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v15i5.74636
4 Ziziphus Jujube
5 *Rhamnaceae*

میوه *عناب* را مورد بررسی قرار داده‌اند و تأثیر *عناب* در جلوگیری و درمان بیماری‌هایی نظیر اختلالات گوارشی، ضعف، چاقی، مشکلات کبدی، دیابت، عفونت‌های پوستی، بی‌اشتهایی، کم‌خونی و آلرژی مؤثر گزارش کرده‌اند (Gao *et al*., 2015 and 2013 و Kim *et al*., 2011و Verma, 2016 و Li *et al*., 2012). در مطالعه‌ای که Wang و همکاران (2014) بر روی میوه عناب انجام دادند 22 ترکیب در عصاره اتانولی عناب شناسایی شد. Zhang و همکاران (2010) طی مطالعه‌ای که انجام دادند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عناب را ناشی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در آن نظیر فلاونوئیدها، فنولیک‌های کل، آنتوسیانیدین‌ها و آسکوربیک اسید می‌دانند. دانشمندان ایتالیایی تأثیر ترکیبات فنولی عصاره میوه عناب بر سلول‌های سرطانی سینه را بررسی کردند (Plastina *et al*., 2012). طی مطالعه انجام شده در کشور مصر تأثیر میوه عناب بر چاقی، چربی خون و عملکرد کبد مورد بررسی قرار گرفت (Mostafa *et al*., 2013). در مطالعه دیگری که روی ترکیبات فنولی میوه عناب انجام شد، تأثیر عناب در درمان تشنج بررسی شد. نتایج نشان داد که عناب دارای خواص محافظتی در برابر تشنج، استرس‌های اکسیداتیو و سایر اختلالات می‌باشد (Pahuja *et al*., 2011). با توجه به معایب روش‌های معمول استخراج، روش‌های مدرن نظیر سیال فوق بحرانی به دلیل مزایا و همچنین به دلیل محدودیت‌های قانونی موجود در صنایع غذایی و دارویی در استفاده از حلال‌های آلی در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری قرارگرفته‌اند (غلامی آوارشک، 1393). بر اساس ترمودینامیک در حالت فوق بحرانی سیال فشار و دمای سیال بالاتر از فشار و دمای بحرانی آن است و بر اساس آن سیالات فوق بحرانی دارای خواص منحصر به فرد دانسیته، ویسکوزیته و حلالیت باشند (Ameer *et al*., 2017). دانسیته این سیالات بسیار شبیه به مایعات می‌باشد که همین عامل قدرت احیاءکنندگی این سیالات را به مایعات نزدیک می‌کند. به‌علاوه ویسکوزیته سیالات فوق بحرانی همانند گازها پایین می‌باشد که این امر قدرت جابجایی و نفوذ این سیالات را در مقایسه با مایعات افزایش می‌دهد (Brglez Mojzer *et al*., 2016 و Valle *et al*., 2006). قدرت حلالیت یا به عبارتی قدرت انتخاب‌پذیری در حالت فوق بحرانی به دانسیته وابسته است و چگالی نیز در این حالت به شدت وابسته به دما و فشار می‌باشد. به‌طورکلی بسیاری از خواص سیالات فوق بحرانی با دانسیته در ارتباط می‌باشد بنابراین با استفاده از پارامترهای مناسب فرآیند می‌توان این خواص را بهبود بخشید (Woźniak *et al*., 2017 Ameer *et al*., 2017, Brglez Mojzer *et al*., 2016,). دما و فشار مهم‌ترین پارامترهای تأثیرگذار در فرآیند سیال فوق بحرانی[1] می‌باشند. فرآیند استخراج بیشتر سیالات فوق بحرانی در دمای پایین انجام می‌شود در نتیجه این فرآیند برای مواد حساس به دما مناسب می‌باشد. استخراج با سیال فوق بحرانی روشی دوستدار محیط زیست می‌باشد و استفاده از آلاینده‌های آلی سمی را محدود می‌کند. همچنین حلال به‌طور کامل از محصول قابل بازیابی است. در این روش با توجه به نوع حلال، دما و فشار، انتخاب پذیری ترکیبات مورد استخراج از ماده گیاهی بهبود یافته و سرعت استخراج تسریع می‌یابد. عدم حضور حلال در محصول نیز باعث بالا رفتن کیفیت محصول نهایی می‌شود (Hauthal, 2001و De Melo *et al*., 2014 و Woźniak *et al*., 2017). فاکتورهای مؤثر بر بازده استخراج سیال فوق بحرانی عبارتند از:

1- انتخاب صحیح حلال: با توجه به ماهیت حرارتی فنولیک‌ها، آب به دلیل نقطه‌جوش بالا حلال مناسبی نمی‌باشد. دی‌اکسید کربن به دلیل قیمت پایین، عدم سمّیت و قابلیت اشتعال کم، در دسترس بودن، نداشتن خطرات زیست محیطی و دارا بودن شرایط بحرانی مطلوب (فشار 7/3 مگا پاسکال، دما 304 کلوین) در استخراج ترکیبات فنولیک که ترکیباتی حساس به دما هستند، حلالی مناسب می‌باشد. از طرفی تخریب و تجزیه حرارتی فنول‌ها در روش فوق بحرانی به شدت کاهش می‌یابد زیرا استخراج در دمای کم و در غیاب اکسیژن و نور صورت می‌گیرد (Moraes *et al*., 2013 و De Melo *et al*. 2014 وBrglez Mojzer *et al*., 2016). کربن دی‌اکسید حلالی مناسب در استخراج ترکیبات غیرقطبی می‌باشد. در صورتی که فنول‌ها ترکیباتی نیمه قطبی می‌باشند به همین خاطر دارای درجه حلالیت پایینی در کربن دی‌اکسید می‌باشند. بنابراین استفاده از آن به‌تنهایی در فرآیند استخراج فنول‌ها نامطلوب می‌باشد (King, 2014). برای غلبه به این محدودیت‌ها از تعدیل‌کننده به‌منظور افزایش قطبیت کربن دی‌اکسید جهت بهبود کارایی در استخراج ترکیبات فنولی استفاده می‌شود (Ameer *et al*., 2017وMoraes *et al*., 2013).

2- اندازه ذرات جامد: نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که اندازه بهینه ذرات در محدوده مش 30-20 فراهم می‌کند که مساحت بالای ذرات را ایجاد کرده که منجر به افزایش انتقال جرم و بهبود بازده ایزوفلاون استخراجی می‌شود که ناشی از افزایش نفوذ حلال به درون ماتریکس گیاه می‌باشد (Zuo *et al*., 2008).

3- محتوای رطوبت ماده گیاهی: مواد جامد قبل از استخراج باید تقریباً خشک شوند زیرا آب موجود در گیاه به شکل یخ درآمده و سدی فیزیکی در برابر عبور سیال فوق بحرانی ایجاد می‌کند. از طرفی ممکن است آب با کربن دی‌اکسید در حل ترکیبات رقابت کند و در میزان انتقال جرم اثر گذارد (Zuo *et al*., 2008 وMoraes *et al*., 2013).

4- زمان استخراج: زمان باید به‌گونه‌ای باشد تا سیال فرصت کافی جهت نفوذ به درون ماتریکس گیاه را داشته باشد. از طرفی زمان‌های طولانی از نظر اقتصادی به صرفه نمی‌باشد. همچنین فشار بالا می‌تواند

1 Supercritical Fluid Extraction (SFE)

باعث صدمه به بافت گیاه شود (Ameer *et al.*, 2017 و Cavalcanti *et al.*, 2012).

در این تحقیق استخراج ترکیبات فنولی عصاره عناب به کمک روش سیال فوق بحرانی کربن دی‌اکسید انجام شده و بهینه‌سازی ترکیبات استخراج شده و اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی میوه گیاه عناب نیز مورد بررسی قرار می گیرد.

مواد و روش‌ها

میوه عناب در اواخر مرداد ماه از شهرستان بیرجند تهیه شد. مواد شیمیایی نظیر اتانول خالص، معرف فولین- سیکالتو، کربنات سدیم و مولکول رادیکال آزاد از شرکت‌های مرک آلمان و سیگما آلدریچ آمریکا و شیشه آلات و وسایل آزمایشگاهی نظیر بالون حجمی، یخچال و فریزر، اسپاتول، ورتکس، بورت، پیپیت، استوانه مدرج، کاغذ صافی، فالکون، بشر دماسنج، مش 30، قیف و ارلن خریداری شدند. میوه‌های خریداری شده تازه و قبل از خشک شدن از درخت جدا شده بودند. پس از جداسازی دانه عناب، میوه در دمای 40 درجه سانتی‌گراد در آون فن دار دیجیتال (حجم 5 لیتر، بایندر، آلمان) کاملاً خشک و به کمک آسیاب خانگی خرد شد. برای اینکه ذرات دارای اندازه یکنواخت باشند پودر حاصل با استفاده از مش 30 غربال و تا زمان استخراج در دمای 20- درجه سانتی‌گراد در یخچال معمولی نگهداری شد.

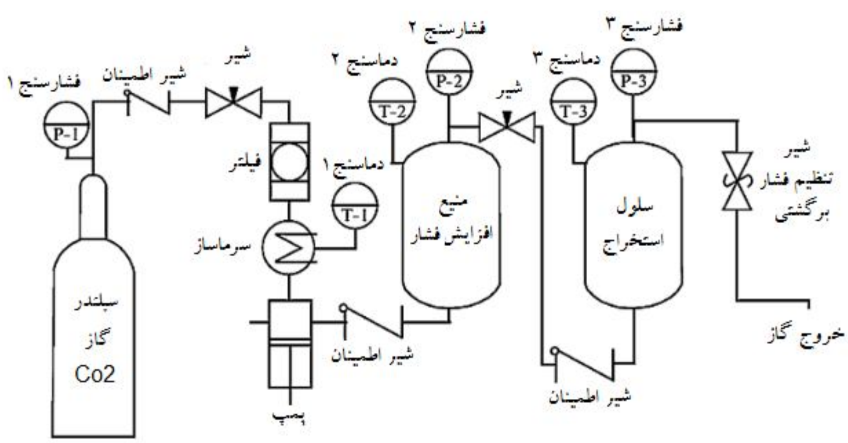
روش استخراج

استخراج به روش حلال

در این تحقیق ابتدا از روش انحلال در حلال اتانول- آب با نسبت‌های مختلف به‌منظور استخراج استفاده شده است. نسبت جامد به حلال ثابت و 1 به 40 (جرمی/ حجمی) در نظر گرفته شد. سایر عوامل نظیر نسبت حلال به حلال، دما و زمان که در فرآیند استخراج تأثیرگذار می‌باشند به‌عنوان متغیر مستقل در فرآیند بهینه‌سازی در نظر گرفته شده‌اند. برای این منظور از روش Wangو همکاران (2014) با کمی اصلاحات استفاده شده است. مقدار 3 گرم پودر عناب در یک بشر با 120 میلی‌لیتر حلال اتانول- آب که با دمای مورد نظر هم‌دما شده است، مخلوط گردید. سپس هیتر مگنت (RH-Basic، ایکا، آلمان) در دمای مورد نظر تنظیم شد و با سرعت 250 دور بر دقیقه همزده شد. پس از اتمام زمان همزدن عصاره به مدت 10 دقیقه در سانتریفوژ (2-16p، سیگما، آلمان) با دور 4000g قرار گرفت و مخلوط نهایی با کاغذ صافی واتمن صاف گردید. عصاره صاف شده با دستگاه تبخیر در خلاء چرخشی (RV8، ایکا، آلمان) در دمای 45 درجه سانتی‌گراد تغلیظ و حلال اتانول خارج شد. باقی‌مانده حلال به کمک دستگاه خشک‌کن انجمادی (alpha-1 2 LD plus، کریس، آلمان) در دمای 50- درجه سانتی‌گراد خارج و پودر حاصله تا زمان آنالیز در یخچال نگهداری گردید.

استخراج به روش فوق بحرانی

استخراج ترکیبات فنولیک پودر عناب توسط دستگاه استخراج با سیال فوق بحرانی که در آزمایشگاه دانشکده مهندسی دانشگاه فردوسی مشهد طراحی و ساخته شده، صورت گرفته است که طرحواره آن در شکل یک آمده است. حلال استخراج کربن دی‌اکسید بود که در درون سیلندر 45 کیلوگرمی (خوراکیان، جاده قوچان، ایران) قرار داشت. در هر مرحله از آزمایش حدود سه گرم از پودر عناب با مش 30 توسط ترازوی آزمایشگاهی دقیق (دقت 0/0001، کرنل، آلمان) توزین و داخل کاغذ صافی پیچیده و درون مخزنی که جهت استخراج تعبیه گردیده، قرار داده شد.



شکل 1- طرحواره دستگاه استخراج به کمک سیال فوق بحرانی

جهت افزایش قطبیت دی‌اکسید کربن فوق بحرانی حدود 10 میلی‌لیتر حلال اتانول و 5 میلی‌لیتر آب مقطر به‌عنوان اصلاحگر به درون مخزن استخراج تزریق گردید تا دی‌اکسید کربن بتواند ترکیبات فنولیک را بهتر در خود حل کند.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولیک به روش فولین- سیکالتو

ابتدا 200 µl از محلول عصاره با غلظت 10 mg/ml به‌همراه 7 ml آب مقطر و 500 µl معرف فولین- سیکالتو درون لوله آزمایش ریخته و بعد از گذشت 4-3 دقیقه یک میلی‌لیتر سدیم کربنات 20% به آن اضافه و حجم کل مخلوط با آب مقطر به10 mlرسانده شد. در نهایت پس از 90 دقیقه جذب محلول در طول‌موج 760 nm در مقابل شاهد خوانده شد (Kozłowska *et al*., 2014).

ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی با رادیکال 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)[1]

محلول 35 ppm رادیکال آزاد 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl در اتانول تهیه شد. سپس به لوله‌های آزمایش حاوی 100 میکرولیتر از عصاره‌های استخراجی با سه غلظت مختلف 3/9 میلی‌لیتر از محلول رادیکال آزاد تهیه شده اضافه گردید و به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد تا تثبیت رنگ حاصل شود. سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب در طول‌موج 515 نانومتر قرائت گردید و درصد به دام‌اندازی رادیکال آزاد طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{A_B - A_S}{A_B}\right)\times 100 \qquad (1)$$

معمولاً نتایج آزمون رادیکال آزاد بر پایه IC50 بیان می‌شود که بیانگر غلظت مؤثری از نمونه‌ها است که ظرفیت مهار 50% از رادیکال‌های آزاد را دارد و از طریق رگرسیون خطی به‌دست آمده از منحنی درصد ممانعت‌کنندگی و غلظت به‌دست می‌آید. برای ترسیم منحنی سه غلظت مختلف از عصاره تهیه شد و آزمون ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی روی آن‌ها انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

روش سطح پاسخ ماتریس آزمایش را بر مبنای تعداد متغیرها و حدود بیشینه و کمینه تعیین شده برای هر متغیر طراحی می‌کند. بدین ترتیب سطوح متغیر در هر آزمون و همچنین تعداد آزمون‌ها مشخص می‌شود. در طراحی آزمایش‌ها، چیدمان به‌گونه‌ای است که حتی در صورت عدم تکرار آزمون، می‌توان به نتایج آماری قابل اعتمادی دست یافت؛ بنابراین این روش سبب تسهیل رویکرد تحقیق، کاهش زمان و سایر هزینه‌های جانبی می‌شود. از طرفی توانایی ارزیابی برهم کنش پارامترها بر یکدیگر را نیز دارا می‌باشد (Gunst, 1996). متغیرهای فرآیند بر اساس آزمایش‌های اولیه انتخاب شدند. جدول آماری آنالیز متغیرها بر روی داده‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 7.0 انجام شد.

در این تحقیق به‌منظور به‌دست آوردن مدل ریاضی، در روش استخراج با حلال، طرح باکس بنکن، با سه متغیر و سه تکرار در نقطه مرکزی طرح، جهت یافتن اثر متغیرها شامل نسبت حلال اتانول- آب، دما و زمان بر پاسخ‌های موردنظر شامل اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بازده استخراج مورداستفاده قرار گرفت که در جدول 1 آمده است.

جدول 1- متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها در روش استفاده از حلال

متغیر مستقل	نماد ریاضی	سطوح متغیر		
		+1	0	-1
زمان(ساعت)	B	5	3	1
نسبت اتانول- آب (حجمی-حجمی)	C	90	65	40
دما (درجه سانتی‌گراد)	A	70	50	30

در روش استخراج با سیال فوق بحرانی دی‌اکسید کربن طرح مرکب مرکزی با دو متغیر و دو تکرار در نقطه مرکزی طرح، جهت یافتن اثر متغیرها شامل دما و فشار بر پاسخ‌های مورد نظر شامل اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنولیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی رادیکال آزاد و بازده استخراج مورد استفاده قرار گرفت. در این حالت نیز سطوح متغیر شامل دو سطح بودند که در جدول 2 آورده شده است.

1 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl

جدول 2- متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها در روش فوق بحرانی

متغیر مستقل	نماد ریاضی	سطوح متغیر		
		+1	0	-1
فشار (بار)	B	400	250	100
دما (درجه سانتی‌گراد)	C	60	45	30

نتایج و بحث

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب به کمک حلال با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

استخراج اولین مرحله برای دستیابی به ترکیبات گیاهی می‌باشد بنابراین روش و شرایط استخراج بسیار تعیین‌کننده است (Chen, 2017). در مطالعات بهینه‌سازی کلاسیک تنها به بررسی یک فاکتور می‌پرداختند و سایر فاکتورها ثابت نگه‌داشته می‌شد. از معایب این بهینه‌سازی می‌توان به زمان‌بر بودن آنالیز، تعداد زیاد مراحل آزمایش و هزینه بالا اشاره کرد. علاوه بر این برهم‌کنش پارامترها بر یکدیگر نیز نادیده گرفته می‌شد. بهینه‌سازی با استفاده از روش پاسخ سطح2 می‌تواند بر این مشکلات غلبه کند (Haaland, 1989 و Gunst, 1996). در تحقیق حاضر از این روش برای بهینه‌سازی استخراج ترکیبات استفاده شده است.

به‌طوری که با داشتن پارامترها و محدوده‌های ذکر شده در جدول 1، تعداد 15 آزمایش توسط نرم‌افزار طراحی شد. فهرست آزمایش‌های طراحی شده و نقاط تعیین‌شده در هر آزمایش در جدول 3 نشان داده شده است. همچنین سه ستون آخر جدول 3، پاسخ‌های محاسبه شده هر آزمایش را پس از انجام نشان می‌دهد.

جدول 3- نتایج طرح آزمایشی مورد استفاده در بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب با روش حلال

آزمون	متغیرهای مستقل			متغیرهای وابسته (پاسخ)	
	نسبت حلال (%1)	زمان(hr)	دما (oC)	IC50 (mg/l)	TPC (mg/gr)
1	40	5	50	522/25	26/619736
2	90	3	70	2283/8	12/543586
3	40	3	70	1124/3	16/84321
4	40	1	50	401/7	26/875666
5	90	1	50	982/1	17/303884
6	65	1	30	1983	13/51623
7	65	3	50	297/5	27/489898
8	90	5	50	1517/8	14/79577
9	65	3	50	356/75	27/285154
10	65	1	70	1046/5	17/047954
11	65	5	70	2583/9	9/216496
12	90	3	30	1732/7	14/232724
13	65	3	50	570/5	26/466178
14	65	5	30	833/8	18/174046
15	40	3	30	614/7	23/343832

گزینش مدل مناسب در روش استخراج با حلال

از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون ضعف برازش آن معنی‌دار نبوده و دارای بیشترین مقدار R2Adj و R2Pred باشد. بهترین مدل برازش یافته در این تحقیق در روش استخراج با حلال، برای هر دو پاسخ مدل درجه دوم می‌باشد که نتایج آنالیز آماری آن در ادامه آورده شده است. مدل‌های ریاضی برای پاسخ با استفاده از روش رگرسیون چندگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. تابع واکنش یک معادله چندجمله‌ای می‌باشد که با معادله زیر داده می‌شود:

2 Response surface methodology (RSM)

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

که b_0 و b_i و b_{ii} و b_{ij} ضرایب رگرسیونی برای به ترتیب عرض از مبدأ، خطی، درجه دوم و برهم‌کنش و x_i و x_j متغیرهای مستقل کدبندی شده هستند.

معادله های مدل برازش داده شده بر پاسخ‌ها با حذف پسخور به‌صورت زیر می باشد:

Total phenol = 27.08 - 1.70 A - 4.35 C – 3.12 AB – 8.62 A2 – 3.97 B2 (3)

IC50= 0.41 + 0.23 A + 0.48 C + 0.66 AB + 0.89 A2 +0.30 B2 (4)

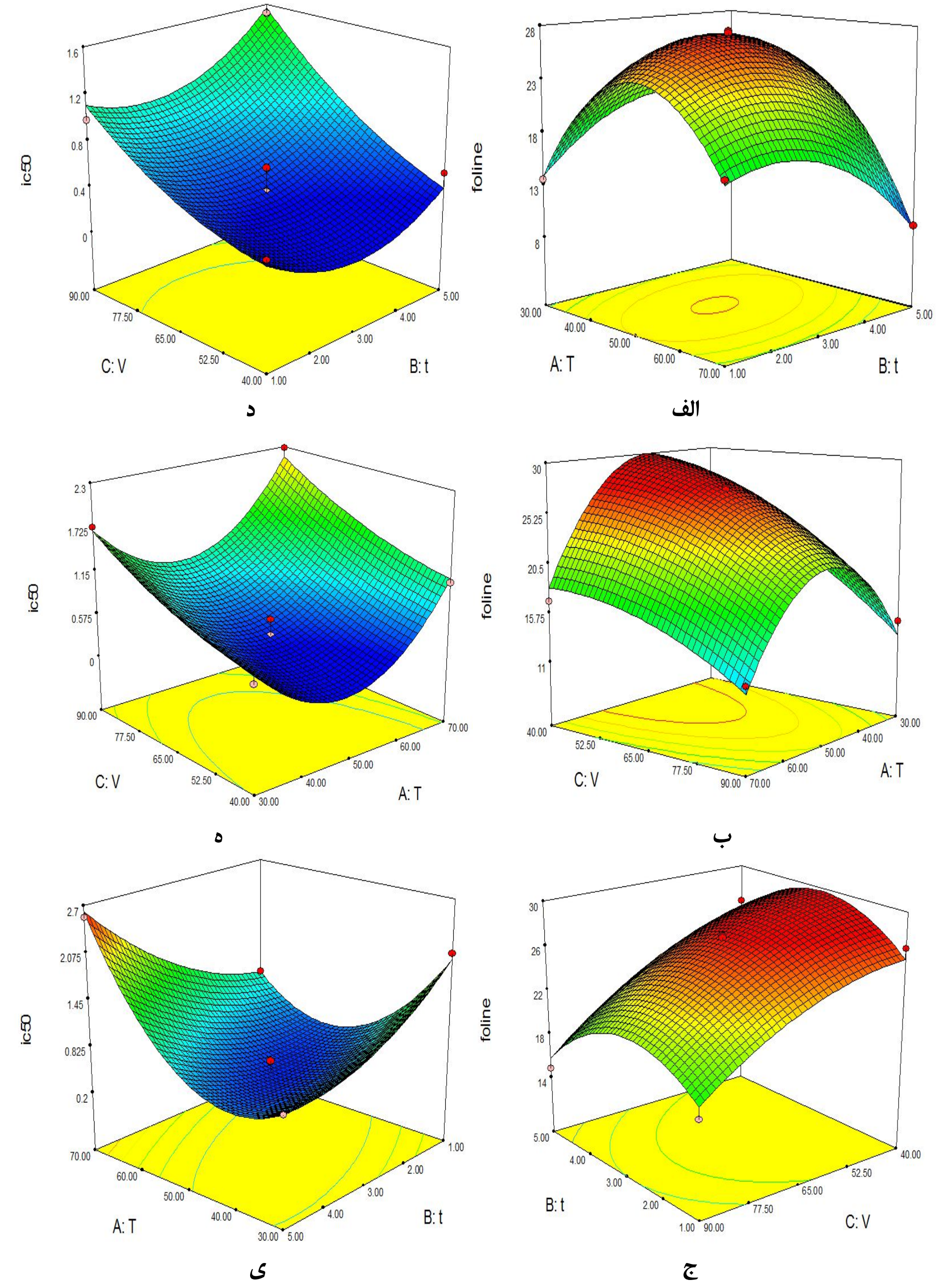
با توجه به نتایج حاصله در مورد میزان فنول کل و IC50 اثر درجه اول نسبت حلال، اثر درجه دوم دما و زمان و همچنین عبارات تاثیر متقابل دما و زمان همه در سطوح 0/99 معنی‌دار بودند. همچنین نتایج نشان داد نسبت حلال‌ها و دما بیشترین تاثیر را بر میزان فنول کل دارند.

آنالیز پاسخ سطح در روش استخراج با حلال

نمودار های سه بعدی اثر متغییرهای مستقل و اثر متقابل هر متغیر مستقلی را بر سیستم نشان می‌دهد. در این نمودارها متغیر وابسته روی محور Z در مقابل دو متغیر مستقل ترسیم شد. با توجه به شکل (3- الف) با افزایش دما تا دمای 50 درجه سانتی‌گراد در نسبت حلال 65% میزان فنول کل افزایش یافته است، پس از آن افزایش دما سبب کاهش میزان فنول کل شده است که نشان می‌دهد افزایش دما تا یک مقداری کشش سطحی و ویسکوزیته حلال را کاهش داده و باعث افزایش بهبود انتقال جرم و سرعت انتشار می‌شود و پس از آن موجب از هم پاشیده شدن ساختار ترکیبات پلی‌فنولی، به علت تجزیه آنزیمی یا تجزیه حرارتی می‌شود (رضایی، 1394و Sutivisedsak *et al.*, 2010). نتایج Xu و همکاران (2012) در استخراج ترکیبات پلی‌فنولی از چای و Zuorro (2015) در استخراج ترکیبات پلی‌فنولی از قهوه اسپرسو نیز نشان می‌دهد که با افزایش زمان در دماهای پایین میزان فنول کل افزایش و در دماهای بالا موجب کاهش می‌شود که این امر به دلیل حساسیت ترکیبات فنولی به دما می‌باشد و قرارگیری بیش از اندازه این ترکیبات در معرض دماهای بالا باعث تخریب ساختار و تجزیه آن‌ها می‌شود.

تغییرات میزان فنول کل با دما و نسبت حلال در زمان ثابت 3 ساعت در شکل (3- ب) نشان داده شده است. با توجه به شکل با افزایش نسبت آب از 10 به 35٪ میزان فنول کل افزایش می‌یابد، که این امر احتمالاً به دلیل تورم سلول‌های گیاهی توسط آب موجود در حلال می‌باشد که با افزایش نسبت آب، سطح تماس بین ماتریکس گیاه و حلال اتانول افزایش می‌یابد همچنین افزایش آب سبب افزایش قطبیت حلال می شود و درنتیجه راندمان استخراج ترکیبات فنولی نیز افزایش‌یافته است (Jovanović et al., 2017 و Xiao et al., 2008). با افزایش میزان آب به 60% میزان فنول کل کاهش می‌یابد که علت این امر می‌تواند افزایش بیش از حد قطبیت حلال باشد. در مطالعه‌ای ترکیبات فنولیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بلوط با حلال‌های مختلف توسط Vázquez و همکاران (2008) موردمطالعه قرار گرفت که با افزایش قطبیت حلال میزان استخراج ترکیبات فنولی نیز افزایش یافت و بیشترین میزان استخراج، در ترکیب دو حلال اتانول- آب با نسبت 50% گزارش‌شده است. در نتایج مشابه دیگری که توسط Jovanovićet و همکاران (2017) در استخراج ترکیبات فنولی از گیاهی بومی و Ćujić و همکاران (2016) در استخراج ترکیبات فنولی از لوبیای خشک شده، نیز گزارش شده افزایش قطبیت تا حدی سبب افزایش میزان فنول شده است. افزایش دما نیز ابتدا سبب افزایش و سپس سبب کاهش شده است. تغییرات میزان فنول کل با زمان و نسبت حلال در دمای ثابت 50 درجه سانتی‌گراد در شکل (3- ج) نشان داده شده است. با توجه به شکل افزایش زمان تا 3 ساعت سبب افزایش میزان فنول کل و پس از آن سبب کاهش می‌شود همچنین نسبت حلال تاثیر بیشتری بر میزان فنول کل داشت.

در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز توجه داشت که هرچه IC50 بیشتر باشد آنتی‌اکسیدان ضعیف‌تر و قدرت رادیکال گیرندگی آن کمتر است. بنابراین عصاره‌های حاوی میزان فنول بیشتر از غلظت مؤثر کمتری برای غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد برخوردار هستند. با مقایسه نتایج حاصل از مقدار ترکیبات فنولی کل و قدرت رادیکال گیرندگی و همانطور که در اشکال (3- د) تا (3- ی) مشاهده می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌هایی که مقدار بیشتر ترکیبات فنولی را در برگیرند، از قدرت رادیکال گیرندگی بالاتری نیز برخوردار هستند. نتایج مشابه در استخراج ترکیبات فنولی از پوست گیاه kinnow (Safdar *et al*., 2017) در استخراج ترکیبات فنولی از چای (Sutivisedsak *et al*., 2010) و Han و همکاران (2015) در بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولی از عناب نشان‌دهنده صحت نتایج حاصله می‌باشد زیرا در تمام این مطالعات نتایج نشان می‌دهد که قدرت رادیکال گیرندگی با میزان فنول کل رابطه مستقیم دارد.



شکل 3- نمودارهای سطح پاسخ پارامترهای استخراج در روش حلال، بر پاسخ‌ها

تعیین شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب در روش حلالی

به‌منظور بهینه‌سازی میزان فنول کل از تکنیک بهینه‌سازی عددی استفاده شد. شاخص‌ها و اهداف بهینه‌سازی برای هر یک از متغیرها و پاسخ‌های فرآیند در جدول 6 آورده شده است.

شرایط بهینه با توجه به شاخص‌های موردنظر دما 43/54 درجه سانتی‌گراد، نسبت حلال 44/92 و زمان 3/46 ساعت به‌دست آمد. با توجه به اینکه مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل و مقادیر واقعی به‌دست‌آمده فاقد اختلاف معنی‌دار بودند می‌توان نتیجه گرفت که مدل‌های به‌دست‌آمده قابل‌قبول و مناسب می‌باشند. مقادیر واقعی گزارش‌شده در جدول 7 میانگین دو تکرار می‌باشند. همچنین IC50 در نقطه بهینه برابر 581/6 میلی گرم به لیتر بدست آمد.

جدول 6- شاخص‌ها و اهداف بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک

متغیرها- پاسخ	هدف	حد پایین	حد بالا	درجه اهمیت
دما	داخل محدوده	30	70	3
زمان	داخل محدوده	1	5	3
نسبت حلال	داخل محدوده	40	90	3
میزان فنول کل	بیشترین			3

جدول7- مقادیر واقعی و پیش‌بینی‌شده میزان فنول کل استخراجی در شرایط بهینه

پاسخ	مقدار پیش‌بینی‌شده	مقدار واقعی
میزان فنول کل (mg/gr)	28/139	26/21

بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب به روش فوق بحرانی با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

در این روش با داشتن پارامترها و محدوده‌های ذکرشده در جدول 2، تعداد 10 آزمایش توسط نرم‌افزار طراحی شد. فهرست آزمایش‌های طراحی شده با روش سیال فوق بحرانی و نقاط تعیین‌شده در هر آزمایش در جدول 8 نشان داده شده است. دو ستون آخر جدول، پاسخ های محاسبه شده هر آزمایش را پس از انجام نشان می‌دهد.

جدول 8- نتایج طرح آزمایشی مورد استفاده در بهینه سازی استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب با روش فوق بحرانی

آزمون	متغیرهای مستقل		متغیرهای وابسته (پاسخ)	
	فشار (bar)	دما (oC)	IC50 (mg/l)	TPC (mg/gr)
1	250	60	17/6622	522/2
2	400	30	23/8045	170/5
3	100	30	15/4612	787/9
4	400	60	11/827	866/2
5	400	45	20/7845	498/4
6	250	45	22/0642	399/3
7	250	30	23/9581	127/17
8	250	45	24/8282	113/3
9	100	45	16/9456	574/2
10	100	60	13/4137	836/4

گزینش مدل مناسب در استخراج فوق بحرانی

در این تحقیق طبق مقادیر R2Adj و R2Pred بهترین مدل برازش یافته در روش استخراج با حلال، برای هر دو پاسخ مدل درجه دوم می‌باشد که نتایج آنالیز آماری آن در ادامه آورده شده است.

معادله‌های مدل برازش داده شده بر پاسخ‌ها با حذف پسخور به‌صورت زیر می‌باشد:

$$\text{Total phenol} = 23.48 - 3.39\,A + 1.77\,B - 2.48\,AB - 2.69\,A2 - 4.64\,B2 \quad (5)$$

$$\text{IC50} = 0.44 + 0.28\,A + 0.26\,AB + 0.27\,A2 + 0.43\,B2 \quad (6)$$

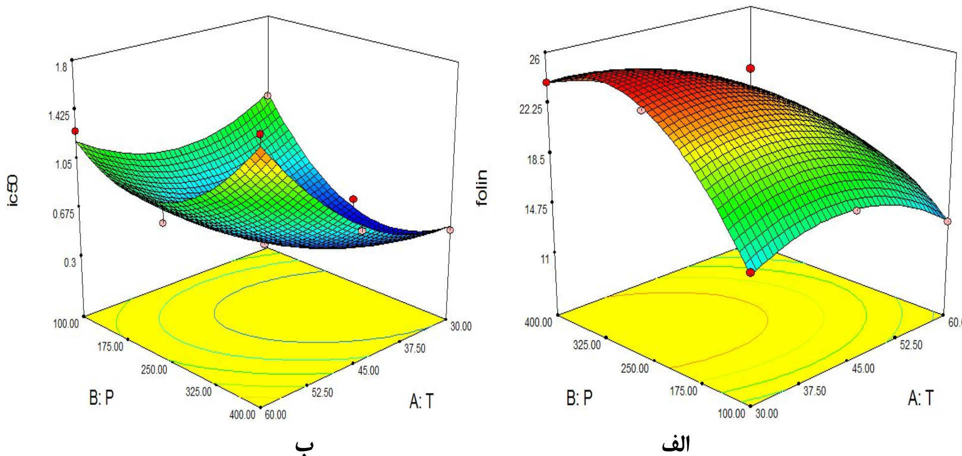
با توجه به نتایج حاصله در مورد میزان فنول کل و IC50 اثر درجه اول دما، اثر درجه دوم فشار و همچنین عبارات تاثیر متقابل دما و فشار همه در سطوح 0/99 معنیدار بودند. همچنین نتایج نشان داد دما و فشار دارای تاثیر تقریباً یکسانی در میزان فنول کل دارند.

آنالیز پاسخ سطح در روش استخراج با سیال فوق بحرانی

همانطور که در شکل (4- الف) مشاهده می‌شود با افزایش فشار تا 250 بار میزان فنول کل افزایش و پس از آن افزایش فشار سبب کاهش میزان فنول کل شده است زیرا افزایش فشار باعث افزایش دانسیته کربن دی‌اکسید و در نتیجه افزایش قدرت انحلال‌پذیری می‌شود از

طرفی افزایش فشار سبب کاهش قدرت نفوذ سیال به درون ماتریکس گیاه نیز می‌شود زیرا با افزایش فشار ویسکوزیته نیز افزایش می‌یابد که این روند سبب کاهش استخراج ترکیبات فنولیک می‌شود. بنابراین افزایش فشار تا حدی سبب افزایش میزان فنول کل استخراجی می‌شود و پس از آن اثر منفی دارد (Paes *et al*., 2014). شرایط بهینه (T=40 و P=250 بار) در استخراج ترکیبات بایو اکتیو از ساقه یک نوع گیاه که توسط Wang و همکاران (2011) گزارش شده و استخراج ترکیبات فنولی و آنتوسیانین از بقایای زغال لخته (T=40 و P=20 مگاپاسکال) که توسط Paes و همکاران (2014) انجام شده است، نشان‌دهنده صحت نتایج می‌باشد.

با توجه به شکل (4- الف) در فشارهای پایین افزایش دما تا حدی سبب افزایش میزان فنول و پس از آن موجب کاهش آن می‌شود. ولی در فشارهای بالا افزایش دما سبب کاهش میزان فنول کل شده است که علت این امر می‌تواند به دلیل قرار گرفتن طولانی ترکیبات فنولی در معرض دماهای بالا باشد زیرا ویسکوزیته افزایش می‌یابد و سرعت انتقال جرم کاهش می‌یابد (Talmaciu *et al*., 2015). در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز همانطور که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش فشار تا 250 IC50 کاهش و پس از آن افزایش فشار سبب افزایش IC50 شده است. با مقایسه نتایج حاصل از مقدار ترکیبات فنولی کل و قدرت رادیکال گیرندگی می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌هایی که مقدار بیشتر ترکیبات فنولی را در برگیرند، از قدرت رادیکال گیرندگی بالاتری نیز برخوردار هستند و با توجه به اینکه IC50 با میزان فنول کل رابطه عکس دارد در نتیجه مقدار IC50 کمتری دارند. نتایج مشابه Woźniak و همکاران (2017) در استخراج ترکیبات فنولیک از لوبیای خشک شده نیز نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین میزان فنول کل و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد. به‌طور کلی می‌توان گفت IC50 وابسته به میزان فنول کل می‌باشد و متناسب با آن تغییر می‌کند.



شکل 4- نمودارهای سطح پاسخ پارامترهای استخراج در روش فوق بحرانی بر پاسخ‌ها

تعیین شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب در روش فوق بحرانی

به‌منظور بهینه‌سازی میزان فنول کل از تکنیک بهینه‌سازی عددی استفاده شد. شاخص‌ها و اهداف بهینه‌سازی برای هر یک از متغیرها و پاسخ‌های فرآیند در جدول 11 آورده شده است.

شرایط بهینه با توجه به شاخص‌های موردنظر دما 34/19 درجه سانتی‌گراد و فشار 323/35 بار به‌دست آمد. مقادیر واقعی گزارش‌شده در جدول میانگین دو تکرار می‌باشند. با توجه به اینکه مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل و مقادیر واقعی به‌دست‌آمده فاقد اختلاف معنی‌دار بودند می‌توان نتیجه گرفت که مدل‌های به‌دست‌آمده قابل‌قبول و مناسب می‌باشند. همچنین IC50 در نقطه بهینه برابر 532/8 میلی‌گرم به لیتر به‌دست آمد.

جدول 11- شاخص‌ها و اهداف بهینه‌سازی استخراج ترکیبات فنولیک

متغیرها- پاسخ	هدف	حد پایین	حد بالا	درجه اهمیت
فشار	داخل محدوده	100	400	3
دما	داخل محدوده	30	60	3
میزان فنول کل	بیشترین			3

جدول12- مقادیر واقعی و پیش‌بینی‌شده میزان فنول کل استخراجی در شرایط بهینه

پاسخ	مقدار پیش‌بینی‌شده	مقدار واقعی
میزان فنول کل	27/32	22/74

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی با توجه به نتایج حاصل از هر دو روش استخراج، میزان فنول کل استخراجی در نقطه بهینه درروش استخراج با حلال برابر 26/21 میلی‌گرم گالیک اسید به گرم عصاره خشک و در روش فوق بحرانی برابر 22/74 میلی‌گرم گالیک اسید به گرم عصاره خشک به‌دست آمد. با مقایسه مقادیر حاصله در نقطه بهینه هر دو روش، روش حلال از میزان فنول کل بیشتری برخوردار بوده و موفق‌تر عمل کرده است. اما با توجه به اختلاف ناچیز در مقادیر فنول کل استخراجی بین دو روش می‌توان روش فوق بحرانی را روشی بهتر در استخراج ترکیبات فنولی معرفی کرد زیرا روش فوق بحرانی با وجود برخورداری از میزان فنول کمتر از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در تست‌ها برخوردار بود چرا که در روش فوق بحرانی با تنظیم دما و فشار می‌توان انتخاب‌پذیری را افزایش داد و ترکیبات هدف را جداسازی نمود که این امر سبب افزایش خلوص و افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی می شود و هدف از استخراج ترکیبات فنولیک عناب خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بود. از طرفی با توجه به کم بودن میزان حلال آلی مصرفی در این روش و کاهش خطرات سلامتی و زیست محیطی، می‌توان روش فوق بحرانی را به‌عنوان روشی مؤثر در استخراج ترکیبات فنولیک از میوه عناب معرفی کرد که باعث کاهش حلال آلی مصرفی می‌شود و از راندمان تقریباً برابری با روش حلال برخوردار است. در مجموع با توجه به میزان فنول کل استخراجی در هر دو روش می‌توان گفت عناب در مقایسه با سایر گیاهان از میزان فنول بالاتری برخوردار بوده و می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در سطح تجاری معرفی گردد.

منابع

رضایی ارمی، س، جعفری، م، خمیری، م، بیات، ه، 1394، استخراج عصاره پوسته گردو واریته شهمیرزادی و تاثیر حلال و روش استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصله، علوم غذایی و تغذیه، 12، 3، 85-98.

غلامی آوارشک، س، سرگلزایی، ج، 1393، استخراج روغن تاجریزی سیاه به کمک سیال فوق بحرانی دی‌اکسید کربن، پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، 10، 4، 387-393.

Ameer, K., Shahbaz, H .M., Kwon, J. H., 2017, Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295-315.

Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Z., Bren, U., 2016, Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects, *Molecules*, 21(7), 901.

Collins, A. R., 2005, Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. European Journal of Cancer, 41(13), 1923-1930.

Cavalcanti, R.N., Navarro-Díaz, H.J., Santos, D.T., Rostagno, M.A., Meireles, M.A.A., 2012, Supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves: chemical composition, economic evaluation and chemometric approach, *Journal of Food Research*, 1(3), 282.

Chen, K., Gao, L., Li, Q., Li, H.R., Zhang, Y., 2017, Effects of CO2 pretreatment on the volatile compounds of dried Chinese jujube (*Zizyphus jujuba* Miller), *Food Science and Technology (Campinas)*, 37(4), 578-584.

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S., 2016, Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique, *Food chemistry*, 194, 135-142.

De Melo, M., Silvestre, A., Silva, C., 2014, Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology, *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 115-176.

Erasto, P., Grierson, D. S., Afolayan, A. J., 2007, Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of Vernonia amygdalina growing in South Africa, *Food chemistry*, 104(2), 636-642.

Gao, Q.H., Wu, C.S., Wang, M., 2013, The jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(14), 3351-3363.

Gao, Q.-H., Bai, C.-F., Wang, M., 2015, Polysaccharides in jujube (*Ziziphus Jujuba* Miller) fruit: Extraction, antioxidant properties and inhibitory potential against a-amylase in vitro, *Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12), 943-949.

Gunst, R. F., 1996, Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, Taylor & Francis Group.

Hauthal, W.H., 2001, Advances with supercritical fluids, *Chemosphere*, 43(1), 123-135.

Haaland, P. D., 1989, Experimental design in biotechnology Marcel Dekker, Inc, United State of America.

Han, H.J., Lee, J.-S., Park, S.-A., Ahn, J.-B., Lee, H.G., 2015, Extraction optimization and nanoencapsulation of jujube pulp and seed for enhancing antioxidant activity, Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces*, 130, 93-100.

Jovanović, A.A., Đorđević, V.B., Zdunić, G.M., Pljevljakušić, D.S., Šavikin, K.P., Gođevac, S.D.M., Bugarski, B.M., 2017, Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques, *Separation and Purification Technology*, 17(9), 369-380.

Kim, Y.-J., Son, D.-Y., 2011, Antioxidant effects of solvent extracts from the dried jujube (Zizyphus jujube) sarcocarp, seed, and leaf via sonication, *Food science and biotechnology*, 20(1), 167-173.

King, J.W., 2014, Modern supercritical fluid technology for food applications, *Annual review of food science and technology*, 5, 215-238.

Kozłowska, M., Żbikowska, A., Gruczyńska, E., Żontała, K., Półtorak, A., 2014, Effects of spice extracts on lipid fraction oxidative stability of cookies investigated by DSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 118(3), 1697-1705.

Li, X.S., Mu, H.X., Huang, H.T., Li, Z., Hu, Q.F., 2012, Phenolic Compounds from the Fruits of *Ziziphus jujuba* Miller, *Asian Journal of Chemistry*, 2(4), 73-75.

Mahajan, R.T., Chopda, M., 2009, Phyto-Pharmacology of Ziziphus jujuba Mill.-A plant review, *Pharmacognosy Reviews*, 3(6), 320-329.

Mostaf, U.E.S., Labban, L., 2013, Effect of *Zizyphus jujuba* on serum lipid profile and some anthropometric measurements, *Advancement in Medicinal Plant Research*, 1(3), 49-55.

Moraes, M.N., Zabot, G.L., Prado, J.M., Meireles, M.A.A., 2013, ObtainingAntioxidants from Botanic Matrices Applying Novel Extraction Techniques, *Food and Public Health*, 3(4), 195-214.

Plastina, P., Bonofiglio, D., Vizza, D., Fazio, A., Rovito, D., Giordano, C., Barone, I., Catalano, S., Gabriele, B., 2012, Identification of bioactive constituents of Ziziphus jujube fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 140(2), 325-332.

Pahuja, M., Mehla, J. , Reeta, K., Joshi, S., Gupta, Y.K., 2011, Hydroalcoholic extract of Zizyphus jujuba ameliorates seizures, oxidative stress, and cognitive impairment in experimental models of epilepsy in rats, *Epilepsy & Behavior*, 21(4), 356-363.

Paes, J., Dotta, R., Barbero, G.F., Martínez, J., 2014, Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) residues using supercritical CO2 and pressurized liquids, *The Journal of Supercritical Fluids*, 95, 8-16.

Preeti, T., Tripathi, S., 2014, Ziziphus jujuba: A Phytopharmacological Review, *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 3(3), 959-966.

Su, P., Liu, X., 2005, Photosynthetic characteristics of linze jujube in conditions of high temperature and irradiation. *Scientia horticulturae*, 104(3), 339-350.

Sutivisedsak, N., Cheng, H., Willett, J., Lesch, W., Tangsrud, R., Biswas, A., 2010, Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Research International*, 43(2), 516-519.

Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., Saddozai, A.A., 2017, Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulate* L.) peel using ultrasound and maceration techniques, *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 488-500.

Talmaciu, A.I., Volf,, I., Popa, V.I., 2015, supercritical fluids and ultrasound assisted extractions applied to spruce bark conversion, *Environmental Engineering and Management Journal* (EEMJ), 14(3), 615-623.

Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M., González-Álvarez,, J., Antorrena, G., 2008, Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (Castanea sativa) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts, *Industrial crops and products*, 28(3), 279-285.

Valle, J.M.D., De La Fuente, J.C., 2006, Supercritical CO2 extraction of oilseeds: review of kinetic and equilibrium models, *Critical reviews in food science and nutrition*, 46(2), 131-160.

Verma, S., 2016, A review on Ziziphus nummularia: valuable medicinal plant desert, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 5(3), 539-542.

Wijngaard, H. H., Rossle, C., Brunton, N., 2009, A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants, *Food Chemistry*, 116(1), 202-207.

Wang, S., Zhang, J., Zhidan, Z., Gao, W., Yan, Y., Ji, X., 2014, Identification of chemical constituents in the extract and rat serum from Ziziphus jujuba Miller by HPLC-PDA-ESI-MSn, *Iranian journal of pharmaceutical research*: IJPR, 13(3), 1055-1063.

Wang, Y., Ying, L., Sun, D., Zhang, S., Zhu, Y., Xu, P., 2011, Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from Ampelopsis grossedentata Stems: Process optimization and antioxidant activity, *International journal of molecular sciences*, 12(10), 6856-6870.

Woźniak, Ł., Marszałek, K., Skąpska, S., Jędrzejczak, R., 2017, the Application of Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol for the Extraction of Phenolic Compounds from Chokeberry Pomace, *Applied Sciences*, 7(4), 322.

Xiao, W., Han, L., Shi, B., 2008, Microwave-assisted extraction of flavonoids from Radix Astragali, *Separation and Purification Technology*, 62(3), 614-618.

Xu, P., Bao, J., Gao, J., Zhou, T., Wang, Y., 2012, Optimization of extraction of phenolic antioxidants from tea (Camellia sinensis L.) fruit peel biomass using response surface methodology, *BioResources*, 7(2), 2431-2443.

Yan, Y.H., Gao, Z.P., 2002, Industrialization of Chinese jujube, *Journal of Northwest Science and Technology University of Agriculture*, 30, 95-98.

Zhao, H.X., Zhang, H.S., Yang, S.F., 2014, Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube, *Food Science and Human Wellness*, 3(3), 183-190.

Zhang, H., Jiang, L., Ye, S., Ye, Y., Ren, F., 2010, Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) from China, *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1461-1465.

Zuo, Y., Zeng, A., Yuan, X., Yu, K., 2008, Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified supercritical carbon dioxide, *Journal of Food Engineering*, 89(4), 384-389.

Zuorro, A., 2015, Optimization of polyphenol recovery from espresso coffee residues using factorial design and response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, 152, 64-69.

Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Vol. 15, No. 5, Dec- Jan 202, p. 529-542

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 5، آذر - دی 1398، ص. 542-529

Optimization of phenolic compounds extraction of *Ziziphus Jujuba* using supercritical fluid of carbon dioxide and measurement of its antioxidant activity

F. Farzaneh Moghaddam[1], J. Sargolzaei[*2], Sh. Bolourian[3]

Received: 2018.08.06
Accepted: 2019.05.05

Introduction: The term antioxidant is said to be compounds that are delaying or preventing oxidization of a substance at their own presence, which leads to reach a stabilized food quality (Collins, 2005). Natural antioxidants are often phenolic compounds that exist in all parts of a plant. These compounds are secondary metabolites that can inhibit active oxygen species by giving hydrogen atoms and converting them into more stable non-radical compounds due to oxidation and reduction properties. They also have the ability to chelate the metals (Wijngaard et al., 2009 and Erasto et al., 2007). Regarding the positive effects of natural antioxidants, many studies have been conducted to extract, identify and apply them from various herbal sources. Edible fruit jujube is a member of the *Ramanaceae* family, known in Iran as the jujube. The plants of the family are jujube flowers, which are all diploid and have 24 chromosomes. The jujube tree has been cultivated in China for thousands of years ago and is used as a medicine, food and food flavoring, also distributed in tropical and subtropical regions of Europe, Australia and South Asia. (Su et. al., 2005, Yan et. al., 2002, Preeti et al. 2014). Phenolic compounds have a high potential for antioxidants and a natural source of antioxidants. The antioxidant capacity of the Jujube is due to its antioxidant compounds such as flavonoids, total phenolic, anthocyanins and ascorbic acid. Zhao et al., 2014) and Zhang et al., 2010). Shell, pulp and fruit jujube seeds have a wide range of phenolic compounds and have long been used as a drug and flavor agent (Zhang et. al., 2010, Mahajan et al., 2009). Many studies have investigated the effects of Jujube fruit and its juice on the prevention and treatment of diseases such as digestive disorders, weakness, obesity, liver problems, diabetes, skin infections, Infections, Anemia, and Allergies have been reported (Gao et al., 2015 and 2013, Kim et al., 2011, Verma, 2016, Li et al., 2012). In a study by Wang et al. on Jujube fruit, 22 compounds were identified in ethanol jujube extracts (Wang et al., 2014). Zhang et al. The study that they carried out showed that the antioxidant activity of the jujube is due to its antioxidant compounds, such as flavonoids, total phenolic, anthocyanidins and ascorbic acid (Zhang et al., 2010). Italian scientists influence the phenolic compounds of jujube fruit extract on breast cancer cells (Plastina et al., 2012). During a study conducted in Egypt, the effect of jujube fruit on obesity, lipid profile and liver function were examined. (Mostafa et al., 2013). In another study on juvenile fruit phenolic compounds, the effect of jujube on seizure treatment was evaluated and the results showed that jujube has protective properties against seizure, oxidative stress and other disorders. Pahuja et al., 2011).

In this research, extraction of phenolic compounds of Ziziphus Jujuba extracts has been performed using the supercritical carbon dioxide fluid method and optimization of the extracted compounds and the measurement of the antioxidant activity of Jujube fruit.

Materials and methods: Jujube fruit was prepared from Birjand in late August. Chemical materials such as pure ethanol, reagent Folin-Cictalto, sodium carbonate and free radical molecules from German-German corporations and Sigma Aldrich, and laboratory glassware and instruments such as volumetric balloons, refrigerators and freezers, spatula, vertex, buret, pipettes, calibrated cylinders, Filter paper, Falcon, Human Dimension, Mesh 30, Funnel and Arlene were provided. The freshly purchased fruits were separated from the tree before drying. After separating the jujube grain, the fruit was dried at 40°C in a digital-powered oven (volume 5 liters made by Binder Company in Germany), and dried with the aid of a home-made mill. For particles of uniform size, the resulting powder was sown using a mesh 30 and kept in a refrigerator at -20°C until it was extracted.

Results & discussion: Generally, according to the results of both solvent extraction and supercritical fluid extraction (SFE) methods, the total amount of phenolic extraction at the optimal point in terms of mg Gallic acid to gram of dry extract in the solvent extraction and in the supercritical method were 26.21 and 2.24, respectively. Comparison of the obtained values at the optimal point of both methods indicated that the solvent method shows higher values of the total phenol content and it has been more successful. However, due to the insignificant differences in total extraction phenol

1 and 2. Former MSc and Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ferdowsi University of Mashhad.
3. Assistant Professor, Department of Food additives, Food Science and Technology Research Institute, Academic Center for Education, Culture and research (ACECR).
(*Corresponding Author Email: Sargolzaei@um.ac.ir)

content between the two methods, the supercritical method can be described as a better way to extract phenolic compounds, since the supercritical method was less effective than antioxidant power despite the presence of phenol, because in the supercritical method, the selectivity can be increased and the target compounds can be isolated by adjusting the temperature and pressure which increases the purity and increase the antioxidant property, and the purpose of the extraction of phenolic compounds. On the other hand, due to the low amount of organic solvent used in this method and the reduction of health and environmental risks, the supercritical method can be introduced as an effective method for extraction of phenolic compounds from *Ziziphus Jujube* fruit, which reduces the consumption of organic solvent and causes in an efficiency equal with solvent method approximately. In general, according to the amount of total phenolic extraction in both methods, it can be said that Jujube has higher phenol content than other herbs and it can be introduced as a natural antioxidant at the commercial level.

Keywords: *Ziziphus Jujuba*, optimization, phenolic compounds, supercritical fluid, antioxidant activity